

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.112.5+577.151.3+602.6

### ВВЕДЕНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ПЕПТИДОВ В ПОВЕРХНОСТНЫЕ ПЕТЛИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

© 2012 г. А. З. Максюттов<sup>1</sup>, А. Ю. Бакулина<sup>1</sup>, Н. И. Гуткина<sup>2</sup>, С. П. Коваленко<sup>2, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., 630559

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, 630117

<sup>3</sup>Медицинский факультет Новосибирского государственного университета, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 08.08.2011 г.

Принята к печати 08.09.2011 г.

В работе описано введение в щелочную фосфатазу чужеродных пептидов, оказывающих минимальное влияние на ферментативную активность белка. В качестве сайтов введения чужеродных пептидов использовали рассчитанные на основе методов молекулярной динамики наиболее длинные поверхностные петли щелочной фосфатазы, не прилежащие ни к активному центру димерного фермента, ни к поверхности контакта между его мономерами. Длину петель оценивали несколькими методами. Две петли использовали для генно-инженерного введения пептидов. Эксперименты показали, что введение нескольких пептидов после остатка Ala218 щелочной фосфатазы незначительно влияет на активность фермента. Согласно экспериментальным данным, выбор петли для введения чужеродного пептида может быть определен методами молекулярной динамики на основе расчета подвижности двугранных углов. Чтобы создать макромолекулы с новыми свойствами путем введения чужеродных полипептидов в ферментативно активные белки, можно использовать на практике оценку длины петли с помощью методов молекулярной динамики.

**Ключевые слова:** щелочная фосфатаза, компьютерное моделирование, поверхностные петли, чужеродные пептиды, вставки.

GUEST PEPTIDE INSERTIONS INTO THE SURFACE LOOPS OF ALKALINE PHOSPHATASE, by A. Z. Maksyutov<sup>1</sup>, A. Yu. Bakulina<sup>1</sup>, N. I. Gutkina<sup>2</sup>, S. P. Kovalenko<sup>2, 3\*</sup> (<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia; <sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia; <sup>3</sup>Department of Medicine, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia; \*e-mail: sp\_kovalenko@yahoo.com). The paper presents the description of the experiments in line with the rational concept for the “safe” insertion of guest polypeptides into the alkaline phosphatase with the minimal influence of the inserts on the enzymatic activity of the protein. Several approaches are described in the paper for the surface loop length estimation and two loops were used as the sites for guest peptides introduction by gene engineering technique. The experiments clearly demonstrate that insertions of several peptides after Ala218 of alkaline phosphatase (the site was selected by loop length analysis) do not block the activity of the enzyme. According to the experimental data, the selection of the loops for the guest peptides insertion can be defined by the mobility of backbone dihedral angles during molecular dynamics simulation of alkaline phosphatase. The paper demonstrates the possibility to use in practice the estimation of loop length based on the mobility of backbone dihedral angles during molecular dynamics simulation. Indeed, it looks that the proteins with new features can be constructed by the introduction of new polypeptides into the enzymatically active proteins.

**Keywords:** alkaline phosphatase, computer modeling, surface loops, guest peptides, insertions.

Создание искусственных белков с новыми свойствами – одна из наиболее актуальных задач современной протеомики. Как правило, констру-

ирование новых белков происходит путем модификации природных белковых молекул, при этом такие операции чаще всего проводятся без де-

Принятые сокращения: *phoA* – ген щелочной фосфатазы *Escherichia coli*; pUC19+*phoA* и pGEM+*phoA* – плазмиды со встройкой гена *phoA*; HbsAg – антиген вируса гепатита В.

\* Эл. почта: sp\_kovalenko@yahoo.com

тального анализа структуры белка. В нашей работе мы использовали методы структурного дизайна для выбора оптимального участка вставки чужеродных полипептидных последовательностей в щелочную фосфатазу таким образом, чтобы ферментативная активность полученного белка не исчезала. Введение чужеродных последовательностей в ферментативно активные белки может быть использовано при конструировании новых белков с комбинированными свойствами, получении гибридных белков с экспонированными пептидами на поверхности ферментативно активной молекулы и изучении белок-белкового взаимодействия. Простое введение чужеродных пептидов в N(C)-концевые последовательности белка часто неэффективно из-за нарушения структурных особенностей чужеродного пептида и из-за подверженности концевых аминокислот деградации протеазами. Введение чужеродных пептидов в петли с большей вероятностью сохраняет структурные свойства вводимых пептидов [1], однако вставки дополнительных аминокислотных последовательностей в различные петли белка по-разному сказываются на ферментативной активности белка и на его стабильности. Щелочная фосфатаза использована для экспериментов по введению чужеродных пептидов в петли как белок с хорошо изученной трехмерной структурой [2] и с легко выявляемой ферментативной активностью [3]. Ранее описаны вставки ди- и трипептидов после аминокислотных остатков Asp129, Ser166, Gln 190, и Lys 383 [3]. Активность фосфатазы можно было обнаружить даже после введения пептида из 15 аминокислот после Ser166 и Gly190 [3]. Вставка фрагмента миоглобина кита между остатками фосфатазы 189 и 190 сохраняла активность фермента, однако фермент полностью инактивировался, если тот же фрагмент помещали между остатками 165 и 166 [4]. Введение эпитопов размером 13 и 15 аминокислот после Glu407 приводило к формированию химерного белка, ферментативная активность которого могла модулироваться антителами к этому эпитопу [5]. Несмотря на ряд успешных экспериментов по введению чужеродных полипептидов в щелочную фосфатазу, рациональные основы выбора района для успешной вставки остаются неясными.

В настоящем исследовании с помощью различных подходов проведена оценка длин петель щелочной фосфатазы для выбора наиболее подходящего для вставки пептидов района. Подобраны два района белка, с помощью методов генетической инженерии в эти районы ввели различные полипептиды и проанализировали влияние встроенных полипептидов на ферментативную активность полученных химерных белков.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Компьютерное моделирование.** Пространственная структура щелочной фосфатазы с разрешением 1.75 Å (код 1ED9) получена из банка белковых структур PDB [6]. Определение вторичной структуры и визуальный анализ проводили с помощью программы Swiss-Pdb Viewer [7].

При моделировании молекулярной динамики щелочной фосфатазы использовали пакет Gromacs [8]. В качестве стартовой конфигурации анализировали цепь A из файла 1ED9. Первые 0.5 нс из 1.5 нс траектории отбросили как время релаксации (среднеквадратичное отклонение атомов белка стабилизировалось уже после 0.35 нс), последующая 1 нс использована для анализа, причем две половины траектории анализировали отдельно, после чего результаты сопоставляли.

Анализ среднеквадратичных флуктуаций атомов в процессе молекулярной динамики производили с помощью программы g\_rmsf из пакета Gromacs, которая вычисляет параметр, эквивалентный B-фактору. Чтобы выделить петли, использовали те же самые критерии, что и для экспериментального значения B-фактора. Значения длин петель, вычисленные по двум половинам траектории, достаточно хорошо совпадали друг с другом.

Чтобы выделить петли по подвижности двугранных углов, использовали следующий алгоритм: началом петли считали такой двугранный угол, начиная с которого не менее  $n$  углов подряд имеют подвижность не менее  $x$ , а концом петли — не менее  $n$  углов подряд с подвижностью не более  $x$ . Подвижность остатков оценивали по отклонениям значений двугранных углов  $\psi$  и  $\phi$ . Так как распределение двугранных углов отличается от нормального, в качестве меры подвижности двугрannого угла использовали разницу между 90 и 10 перцентилями. Параметры  $n$  и  $x$  подбирали из следующих соображений: участки с регулярной вторичной структурой не должны выделяться как петли, и результаты для первой и второй половины анализируемой траектории должны в достаточной степени совпадать. В итоге выбраны следующие параметры:  $x = 45$ ,  $n = 4$ .

**Материалы.** Плазмиду pCGVI, содержащую ген щелочной фосфатазы *E. coli*, предоставил доктор Гузман [9]. В работе также использовали плазмиды pUC19 и pGEM7Zf(+) фирмы "Promega" (США), эндонуклеазы рестрикции и T4 полинуклеотидкиназу фирмы "Сибэнзим" (Россия), T4 ДНК-лигазу, Taq-ДНК-полимеразу, дезокси-нуклеотидтрифосфаты фирмы "Лаборатория Медиген" (Россия), 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-фосфат (X-фосфат или BCIP), пара-нитрофенил-фосфат фирмы "Sigma" (США), агарозу фирмы "Peqlab Biotechnology GmbH" (Германия), гуанидинизотиоцианат, хлористый кальций, хлори-

стый магний, пептон, дрожжевой экстракт и БактоАгар фирмы “Fluka” (Швейцария). Для трансформации использовали штамм *E. coli* XL1-Blue фирмы “Stratagene” (США). Олигонуклеотиды синтезированы на фирме “Лаборатория Меди-ген” (Россия, Новосибирск).

**Вставка чужеродных фрагментов ДНК в ген щелочной фосфатазы *E. coli* между Gln253 и Lys254.** С целью получения вставок в ген щелочной фосфатазы *E. coli* мы использовали технику замещения небольших фрагментов ДНК гена *phoA* на химически синтезированные фрагменты соответствующей структуры. Химически синтезированные комплементарные олигонуклеотиды фосфорилировали Т4 полинуклеотидкиназой, отжигали, и полученные дуплексы лигировали с подходящим вектором. В случае получения вставок после Gln253 клонируемые фрагменты получали лигированием 2–3 химически синтезированных дуплексов размером 30–60 п.н. Все варианты вставок в этот район представлены в разделе “Результаты”.

Чтобы получить вставку 1-го фрагмента ДНК в ген щелочной фосфатазы *E. coli* между кодонами Gln253 и Lys254 (Acc. no. M13345 GenBank), EcoRI-EcoRI-фрагмент гена щелочной фосфатазы (*phoA*) переклонировали из плазмиды pCGVI в плазмиду pUC19 в прямой ориентации относительно гена LacZ $\alpha$ . Затем из этой плазмиды удалили фрагмент KpnI-Bsp19I и заместили его на химически синтезированный, содержащий выбранную нами последовательность после триплета, кодирующего Gln253. С этой целью плазмидную ДНК гидролизовали эндонуклеазами рестрикции KpnI и Bsp19I, элюировали из геля после электрофоретического разделения продуктов рестрикции и лигировали с химически синтезированным фрагментом.

На следующем этапе провели клонирование EcoRI-EcoRI-фрагмента *phoA*, содержащего вставку после Gln253, в целую последовательность *phoA*. Так как плазида pCGVI, кроме двух сайтов EcoRI в гене *phoA*, содержит еще один сайт EcoRI в полилинкере, всю последовательность *phoA* (XhoI-BamHI-фрагмент плазмиды pCGVI) переклонировали в плазмиду pGEM7Z по сайтам XhoI и BamHI. В результате удаляли фрагмент, содержащий сайты EcoRI полилинкеров плазмид pCGVI и pGEM7Z. Полученную плазмиду (pGEM+*phoA*) использовали в качестве вектора для клонирования EcoRI-EcoRI-фрагмента *phoA* со вставкой.

XbaI-SacI-фрагменты плазмид (pGEM+*phoA*) со вставкой и без нее переклонировали в плазмиду pUC19. Чтобы получить остальные варианты вставок после Gln253, плазмиду pUC19+*phoA* с 1-ой вставкой гидролизовали эндонуклеазами рестрикции CciNI и BstXI, отделили от CciNI-BstXI-фрагмента электрофорезом в 1%-ной агарозе,

элюировали из геля и лигировали с химически синтезированными фрагментами соответствующей структуры.

**Вставка чужеродных фрагментов ДНК в ген щелочной фосфатазы *E. coli* между Ala218 и Gly219.** При встраивании химически синтезированных фрагментов ДНК в этот район сначала с помощью ПЦР проводили однонуклеотидную замену (без смены аминокислоты) в кодоне Ala218 (T999→G) с целью получения сайта узнавания эндонуклеазы рестрикции SacII. Замену производили методом ПЦР с использованием следующих праймеров:

F1 (старт – 783)  
5'-CGTTTCTACCGCAGAGTTGC-3'  
R1 (старт – 1004)  
5'-TCACCCGCGGTTGCCGTTTC-3'  
F2 (старт – 985)  
5'-GAAACGGCAACCGCGGGTGAATGG-3'  
R2 (старт – 1238)  
5'-GGTACACTGTTCATTACGTTGC-3'.

В последовательностях праймеров F2 и R1 подчеркнуты замены нуклеотидов, необходимые для направленного мутагенеза, а также выделен сайт узнавания SacII. Сначала проводили ПЦР с использованием праймеров F1/R1 и F2/R2. Полученные ампликоны очищали элюцией из геля, смешивали и проводили ПЦР с использованием праймеров F1/R2. Реакции проводили в термоциклере Терцик (ДНК-технология, Москва, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 0.01% Twin 20, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 300 мкМ каждого dNTP, 0.5 мкМ каждого праймера, 20 нг плазмидной ДНК и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы. Условия термоциклирования: денатурация 94°C – 2 мин, затем 30 циклов (94, 64 и 72°C по 20, 30 и 60 с соответственно). Полученный ампликон осаждали этанолом, растворяли в воде, проводили рестрикцию ферментами Rsr2I и BstXI и лигировали с плазмидной ДНК pUC19+*phoA*, линейаризованной Rsr2I и BstXI.

ДНК плазмиды pUC19+*phoA* с сайтом SacII гидролизовали эндонуклеазой рестрикции Sfr303 I и использовали в качестве вектора для клонирования следующих химически синтезированных дуплексов:

- GGGCGGTGGCGGAGC  
CGCCCCGCCACCGCCT
- GGGCGGTGGCGGAGGTGGCGGTGGAGC  
CGCCCCGCCACCGCCTCCACCGCCACCT
- GGGCGGTGGCGGAGGTGGCGGCGGT-  
CGCCCCGCCACCGCCTCCACCGCCGCCA-  
GGTGGCGGTGGAGC  
CCACCGCCACCT

**Таблица 1.** Оценка длин петель щелочной фосфатазы по различным критериям

Район щелочной фосфатазы (номера аминокислотных остатков)	Длина участка без регулярной вторичной структуры	Длина петли по В-фактору атомов $\text{Ca}$ (рентгеноструктурный анализ)	Длина петли по В-фактору атомов $\text{Ca}$ (молекулярная динамика)	Длина петли по подвижности двугранных углов (молекулярная динамика)
139–141	3	0	1	3
178–190	13	6	7	4
216–222	7	8	9	8
233–234	2	0	1	2
238–239	2	0	0	0
246–253	8	15	10	0
270–286	17	8	1	0
290–298	9	6	3	0
312–315	4	5	2	8
393–395	3	0	5	0

**Трансформация, выделение и анализ плазмидных ДНК.** Для клонирования фрагментов ДНК клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue) трансформировали лигазной смесью вектор-фрагмент. Компетентные клетки *E. coli* получали стандартным методом с применением  $\text{CaCl}_2$ . Клеточную суспензию высевали на 1.5%-ный агар, содержащий 50 мкг/мл ампициллина, 12.5 мкг/мл тетрациклина, 160 мкг/мл X-фосфата. Плазмидную ДНК исследуемых клонов выделяли из ночных культур стандартным методом щелочного лизиса.

Структуру плазмидных ДНК подтверждали рестрикционным анализом. В случае введения одонуклеотидной замены T999→G и клонирования химически синтезированных фрагментов проводили секвенирование ДНК по методу Сэнгера [10]. С этой целью проводили секвенирование амплификатов, полученных с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов, комплементарных последовательностям, окружающим полилинкер плазмиды pUC19: (F) 5'-CAGCTATGACCATGAT-TACG-3' и (R) 5'-ACGTTGTAACACGACGGC-CAG-3'. Режим амплификации: денатурация – 94°C – 2 мин; затем 30 циклов (94, 60 и 72°C по 15, 25 и 60 с соответственно).

В качестве секвенирующих праймеров использовали олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям, окружающим вставки:

(F) 5'-GGCGGCGGCGCAAAAACC-3'  
(старт – 961) и

(R) 5'-GTGCCTGTTCACGCAGCG-3'  
(старт – 1036).

**Определение активности щелочной фосфатазы *in situ*.** Культуры клеток *E. coli* с рекомбинантными плазмидами (по 3 клона для каждого варианта) выращивали в среде LB, содержащей ампициллин и тетрациклин при 37°C до оптической плот-

ности 0.4–0.6 при 600 нм. В реакционную смесь, содержащую 0.05 М Трис-НCl, pH 8.0; 1мМ  $\text{MgCl}_2$  и 100–200 мкл культуры, добавляли 2 капли хлороформа и 1 каплю 0.1%-ного SDS. Суспензию встряхивали, выдерживали 5 мин при 37°C, добавляли пара-нитрофенилфосфат до конечной концентрации 4 мг/мл и измеряли оптическую плотность при 410 нм через равные промежутки времени в течение 4–5 ч. Измерения проводили 8–10 раз для каждой культуры. Условия определения активности щелочной фосфатазы *E. coli* взяты из on-line-протокола “*E. coli* Alkaline Phosphatase Assay” [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Выбор сайтов, наиболее подходящих для вставки чужеродных пептидов

Визуальный анализ модели щелочной фосфатазы позволяет выявить 16 поверхностных петель. Природная щелочная фосфатаза – димер [12]. Учитывая, что димеризация необходима для проявления активности фермента [13], петли, прилежащие к поверхности контакта между мономерами не рассматривали как потенциальные сайты для введения чужеродных пептидов. По аналогичным соображениям не рассматривали и петли, прилежащие к активному центру фермента. В конечном счете, рассматривали 10 поверхностных петель щелочной фосфатазы (табл. 1).

В-факторы, полученные на основе рентгеноструктурных данных, позволили получить подвижности атомов в структуре белка. В-факторы атомов  $\text{Ca}$  могут быть использованы для оценки гибкости полипептидной цепи [14]. Анализ траектории, полученной при моделировании белка методом молекулярной динамики, позволяет вычислить величину, аналогичную эксперименталь-

но определенному В-фактору. Мы определяли границы поверхностных петель щелочной фосфатазы по подвижности двугранных углов на основе В-факторов, определяемых в процессе изучения структуры белка методом рентгеноструктурного анализа, а также полученных в процессе моделирования с использованием метода молекулярной динамики.

В случае семи из десяти петель результаты отличались на три (или меньше) аминокислотных остатка, для петли 246–253 разные методы давали аналогичную длину, а для петель 270–286 и 393–395 аналогичные расчеты приводили к существенным отличиям.

Аналогичные критерии могут базироваться не на подвижности атомов  $S\alpha$ , а на двугранных углах  $\psi$  и  $\phi$ . Подвижность этих углов можно рассматривать как более естественную меру гибкости петель. Поскольку распределение значений двугранных углов при моделировании молекулярной динамики мультимодально, мы использовали разницу между 90 и 10 перцентилями как эквивалент значению В-фактора. Результаты оценки длины петель с использованием различных подходов приведены в табл. 1.

Метод двугранных углов для района 246–253 петли не выявил, хотя другие методы идентифицировали протяженную петлю. Возможно, это свидетельствует о возможности движения петли только в качестве единого целого. На основании проведенного анализа для встройки чужеродных петель в последующих экспериментах были выбраны районы 216–222 и 246–253. В районе 216–222 все методы обнаружили петлю. Причем разные методы давали одинаковую длину петли. В районе 246–253 двумя критериями выявлена петля с максимальной длиной, хотя метод двугранных углов не нашел петлю в этом районе. Таким образом, выбраны различающиеся по характеристикам петли, находящиеся вдали от активного центра фермента и не участвующие в формировании димера.

#### **Введение чужеродных пептидов в выбранные районы щелочной фосфатазы с использованием методов генной инженерии**

Несколько чужеродных пептидов встроили между Gln253 и Lys254, а также между Ala218 и Gly219 щелочной фосфатазы *E. coli*. Чтобы встроить чужеродные полипептиды в щелочную фосфатазу, проводили вставку фрагментов ДНК в соответствующие сайты гена, кодирующего щелочную фосфатазу. Аминокислотные последовательности чужеродных пептидов, встроенные после Gln253, и соответствующие нуклеотидные последовательности представлены в табл. 2.

#### **Вставка чужеродных пептидов после Gln253**

Введение 24-нуклеотидного фрагмента (фрагмент 1) в щелочную фосфатазу проводили с использованием клонирования химически синтезированных олигонуклеотидов в плазмидах pGEM7Z и pUC19 (см. “Экспериментальная часть”). В результате нескольких последовательных клонирований получена плазмида pUC19+phoA1, несущая ген *phoA* со вставкой фрагмента ДНК после кодона Gln253.

Колонии *E. coli*, несущие плазмиду pUC19+phoA1, были бледно-голубыми на чашках с соответствующей индикаторной средой, а колонии *E. coli*, несущие плазмиду с исходным геном *phoA*, – ярко-голубыми на чашках с той же индикаторной средой. Изменение цвета колоний явно связано с уменьшением активности фосфатазы в результате встраивания чужеродного пептида в тело фермента.

Плазмиду pUC19+phoA1 использовали для вставки ряда полипептидов после Gln253 (табл. 2, фрагменты 2–4). Плазмиду pUC19+phoA1 гидролизовали эндонуклеазами рестрикции CciNI и BstXI, смешивали с олигонуклеотидными дуплексами соответствующей структуры, инкубировали с ДНК-лигазой. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Плазмиду pUC19+phoA2 получали удалением последовательности GCATTTAAATTA из плазмиды pUC19+phoA1. Плазмида pUC19+phoA3 содержала в гене *phoA* вставку, кодирующую Gly8, Ser3, Thr2 и Ala2. Аминокислоты выбрали так, чтобы чужеродный пептид был гидрофильным, без ароматических или сильно заряженных аминокислот. Плазмида pUC19+phoA4 содержала фрагмент (139–147 аминокислоты) поверхностного антигена вируса гепатита В (HbsAg).

Цвет колоний, содержащих плазмиды pUC19+phoA2, pUC19+phoA3 и pUC19+phoA4, был более насыщенным по сравнению с цветом колоний, содержащих плазмиду pUC+phoA1. Однако все колонии *E. coli*, несущие плазмиды с модифицированной фосфатазой, были существенно бледнее колоний, несущих плазмиду с немодифицированным геном щелочной фосфатазы.

#### **Вставка чужеродных пептидов после Ala218**

При конструировании плазмид, несущих вставки после кодона Ala218, в кодоне Ala218 была введена точечная замена T→G в позиции 999 (см. “Экспериментальная часть”). В результате такой модификации сформировался сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции SacII. В дальнейшем соответствующие химически синтезированные олигонуклеотидные дуплексы клонировали прямо в сайте SacII плазмиды pUC19+phoA. В табл. 3 приведены структуры фрагментов, кло-

Таблица 2. Вставки между Gln253 и Lys254 (выделены цветом)

Плазмиды	Вставки	Структура чужеродных пептидов
1 pUC19+ phoA1	<p>KpnI EcoRI CciNI</p> <p>GGTACcgagctcgaattcggtagcgggaagcgaatcagcaaggtagtgcggccgcaatttaataaaacc</p> <p>ValProSerSerAsnSerValThrGluAlaAsnGlnGlnGlySerAlaAlaPheLysLeuLysPro<sup>254</sup></p> <p>ctgcttgccctgtttgctgacgggcaatatgccagtcgctggctaggaccgaaagcaacgtaccATGGC</p> <p>LeuLeuGlyLeuPheAlaAspGlyAsnMetProValArgTrpLeuGlyProLysAlaThrTyrHisGly</p> <p>BstXI Bsp19I</p>	GlySerAla <sub>3</sub> PheLysLeu
2 pUC19+ phoA2	<p>CAAGGTAGTGCggccaaacccctgcttggcctgtttgctgacgggcaatatgcccagtcgctGG</p> <p>GlnGlySerAlaAlaLysProLeuLeuGlyLeuPheAlaAspGlyAsnMetProValArgTrp</p> <p>253 254 BstXI</p>	GlySerAla <sub>2</sub>
3 phoA3	<p>CAAGGTAGTGCggccgggaggaggaaactgtaggaggaactgtaaacccctgcttggcctg</p> <p>GlnGlySerAlaAlaGlyGlyGlySerThrGlyGlyThrSerLysProLeuLeuGlyLeu</p> <p>253 254</p> <p>tttgctgacgggcaatatgcccagtcgctGG</p> <p>PheAlaAspGlyAsnMetProValArgTrp</p> <p>BstXI</p>	GlySerAla <sub>2</sub> Gly <sub>5</sub> SerThrGly <sub>2</sub> ThrSer
4 phoA4	<p>CAAGGTAGTGCggcc [tgcaaaaagccacagacggaaactgt] acaggaaaaacccctgcttggcctg</p> <p>GlnGlySerAlaAla [CysThrLysProThrAspGlyAsnCys] ThrGlyLysProLeuLeuGlyLeu</p> <p>253 254</p> <p>tttgctgacgggcaatatgcccagtcgctGG</p> <p>PheAlaAspGlyAsnMetProValArgTrp</p> <p>BstXI</p>	GlySerAla <sub>2</sub> [HbsAg] ThrGly

Примечание. В квадратных скобках – фрагмент HbsAg (139–147 аминокислоты). Последовательности химически синтезированных фрагментов показаны строчными буквами.

Таблица 3. Вставки между Ala218 и Gly219

	Встройки	Структура чужеродных пептидов
1	GCgggcggtggcggagcGGGT AlaGlyGlyGlyGlyAlaGly 218 219	Gly <sub>4</sub> Ala
2	GCgggcggtggcggaggtggcggcggtggtggcggtggagcGGGT AlaGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyAlaGly 218 219	Gly <sub>12</sub> Ala
3	GCgggcggtggcggaggtggcggcggtggtggcggtggagcgggcggtggcggaggtggc AlaGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyAlaGlyGlyGlyGlyGlyGly 218 ggcggtggtggcggtggagcGGGT GlyGlyGlyGlyGlyGlyAlaGly 219	Gly <sub>12</sub> AlaGly <sub>12</sub> Ala
4	GCtccgccaccgcccgcGGGT AlaProProProProAlaGly 218 219	Pro <sub>4</sub> Ala
5	GCtccaccgcccacctccgccaccgcccgcGGGT AlaProProProProProProProProAlaGly 218 219	Pro <sub>8</sub> Ala
6	GCtccaccgcccaccgcccgcacctccgccaccgcccgctccaccgcccaccaccgccc AlaProProProProProProProProProProProProAlaProProProProProPro 218 ccacctccgcccaccgcccgcGGGT ProProProProProProAlaGly 219	Pro <sub>12</sub> AlaPro <sub>12</sub> Ala

Примечание. Последовательности химически синтезированных фрагментов показаны строчными буквами.

нированные в SacII-сайте модифицированной плазмиды pUC19+phoA, а также соответствующие аминокислотные последовательности. Во всех случаях на индикаторных чашках получены интенсивно окрашенные колонии *E. coli*. Интенсивность окраски колоний *E. coli* в случае всех вариантов вставки чужеродных пептидов после Ala218 значительно превосходила интенсивность окраски колоний *E. coli*, экспрессирующих фосфатазу со вставками после Gln253.

#### Оценка ферментативной активности модифицированных щелочных фосфатаз

Ферментативную активность щелочной фосфатазы после различных модификаций оценивали, как описано в разделе “Экспериментальная часть”. Во всех случаях использовали пара-нитрофенилфосфат в качестве субстрата. В качестве контроля использовали клетки *E. coli*, несущие плазмиду pUC19 и клетки *E. coli*, несущие плазмиду с немодифицированным геном *phoA*. Результаты оценки активности фосфатаз приведены на рисунке. Все вставки уменьшали активность щелочной фосфатазы, но, как и ожидалось,

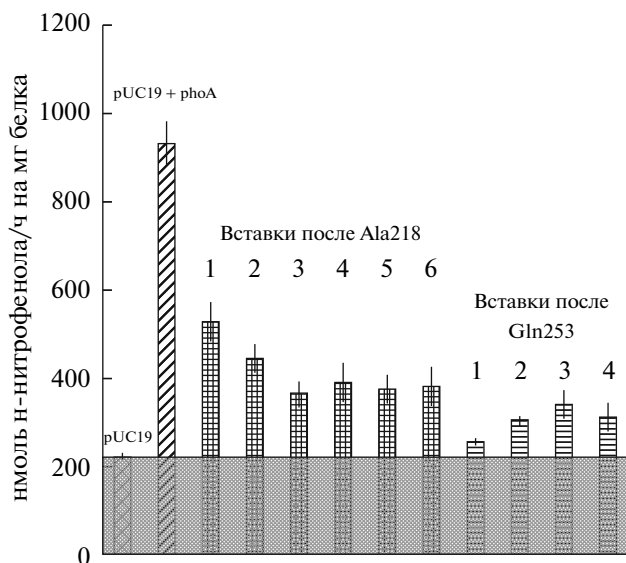
уменьшение активности зависело от места вставки и от структуры чужеродного пептида.

Введение (Gly)<sub>4</sub>Ala после Ala218 приводила к минимальному уменьшению активности фермента. В случае вставки GlySerAlaAla после Gln253 ферментативная активность падала на порядок и более по сравнению с нативным ферментом. Фосфатазная активность фермента со вставкой 13 аминокислот (Gly)<sub>12</sub>Ala после Ala218 более чем в 2 раза превышала активность при введении всего лишь четырех нейтральных аминокислот GlySerAlaAla после Gln253.

Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод, что вставки чужеродных пептидов при встраивании после Gln253 значительно снижают активность фермента, тогда как вставки пептидов после Ala218 приводят лишь к небольшому уменьшению активности фермента.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время не существует исчерпывающих правил выбора сайтов в молекуле белка, при вставке в которые чужеродный пептид приводил бы к минимальным изменениям исходного



Оценка активности щелочной фосфатазы в клетках *E. coli*, трансформированных различными рекомбинантными плазмидами. Клетки *E. coli*, несущие плазмиду pUC19 без вставки гена *phoA* (pUC19) или с немодифицированным геном *phoA* (pUC19+*phoA*). Обозначения для клеток, несущих плазмиды pUC19+*phoA* со вставками после Ala218 (1–6) и после Gln253 (1–4), соответствуют табл. 2 и 3. Представлены результаты трех экспериментов (8–10 измерений в каждом). Диаграмма отражает средние значения и стандартные отклонения. Базальный уровень активности щелочной фосфатазы (клетки с плазмидой pUC19 без вставки гена *phoA*) выделен цветом (серый прямоугольник).

белка. Общие рассуждения согласуются с экспериментами о значительном влиянии вставки в альфа-спирали и бета-структуры белка [15–18]. Чтобы оценить дестабилизацию белковой структуры при введении полиглицинов в петли белка, предложено следующее уравнение [19, 20]:

$$\Delta\Delta G = -cRT \ln(l_{\text{new}}/l_{\text{old}}),$$

где  $l_{\text{old}}$  — это длина петли до вставки,  $l_{\text{new}}$  — это длина той же петли после вставки,  $R$  — газовая константа,  $T$  — температура,  $\Delta\Delta G$  — разница свободных энергий между нативным и денатурированным состоянием белка,  $c$  — константа со значением 2.41 для белков. Основное значение этого уравнения можно выразить просто: чем длиннее петля, тем более длинный чужеродный пептид может быть вставлен в эту петлю без существенного воздействия на исходную структуру белка. К сожалению, эксперименты не показывают хорошего соответствия между расчетными и измеряемыми изменениями свободной энергии [20]. Наиболее вероятно, что основная причина таких несоответствий — неверно определенная длина петли.

Мы предложили несколько критериев определения длины петель для белков с известными рентгеноструктурными данными. Прежде всего, можно использовать В-фактор для оценки подвижности аминокислотных остатков. ЯМР-анализ обеспечивает прямое измерение подвижности петли в растворе, тогда как данные рентгеноструктурного анализа дают сведения только о закристаллизованном белке. Безусловно, эта информация может сильно различаться. В целом, данные по молекулярной динамике хорошо согласуются с соответствующими ЯМР-измерениями [21–23]. Следовательно, молекулярная динамика вполне может быть использована для оценки подвижности петель белка в водном растворе.

Похоже, что использование анализа подвижности двугранных углов для определения длины петель дает более адекватные результаты, чем анализ смещения атомов  $\alpha$ . Причиной могут быть сильные внутренние взаимодействия внутри петли.

В данном исследовании мы показали, что петли с увеличенной длиной, рассчитанной на основе анализа двугранных углов, обладают большей толерантностью к введению пептидов, чем петли с увеличенной длиной, рассчитанной на основе В-фактора.

Судя по результатам, молекулярная динамика может служить недорогим и надежным методом оценки гибкости петель в белке с известной пространственной структурой при введении чужеродных полипептидов. Вполне возможно, что молекулярная динамика может быть удобным инструментом при дизайне искусственно создаваемых белков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мещерякова Ю.А., Эльдаров М.А., Мигунов А.И., Степанова Л.А., Репко И.А., Киселев О.И., Ломоносов Д.П., Скрыбин К.Г. 2009. Химерные частицы вируса мозаики коровьего гороха, несущие внеклеточный домен белка М2 вируса гриппа типа А. Получение и характеристика. *Молекуляр. биология.* **43**, 751–760.
2. Stec B., Holtz K.M., Kantrowitz E.R. 2000. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J. Mol. Biol.* **299**, 1303–1311.
3. Freimuth P.I., Taylor J.W., Kaiser E.T. 1990. Introduction of guest peptides into *Escherichia coli* alkaline phosphatase. Excision and purification of a dynorphin analogue from an active chimeric protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 896–901.
4. Freimuth P., Steinman R.M. 1990. Insertion of myoglobin T-cell epitopes into the *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Res Microbiol.* **141**, 995–1001.
5. Brennan C.A., Christianson K., La Fleur M.A., Mandeck W. 1995. A molecular sensor system based on genetically engineered alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 5783–5787.



6. Guex N., Peitsch M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. **18**, 2714–2723.
7. <http://www.pdb.org>
8. <http://www.gromacs.org/>
9. Guzman C.A., Piatti G., Walker M.J., Guardati M.C., Pruzzo C. 1994. A novel *Escherichia coli* expression-export vector containing alkaline phosphatase as an insertional inactivation screening system. *Gene*. **148**, 171–172.
10. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 5463–5467.
11. <http://www.bio.com/protocolstools/protocol.jhtml?id=p126>
12. Orhanović S., Pavela-Vrancic M. 2003. Dimer asymmetry and the catalytic cycle of alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. *Eur J. Biochem*. **270**, 4356–4364.
13. Boulanger R.R. Jr., Kantrowitz E.R. 2003. Characterization of a monomeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution. *J. Biol. Chem*. **278**, 23497–23501.
14. Smith D.K., Radivojac P., Obradovic Z., Dunker A.K., Zhu G. 2003. Improved amino acid flexibility parameters. *Protein Sci*. **5**, 1060–1072.
15. Betton J.M., Martineau P., Saurin W., Hofnung M. 1993. Location of tolerated insertions/deletions in the structure of the maltose binding protein. *FEBS Lett*. **325**, 34–38.
16. Sibanda B.L., Thornton J.M. 1993. Accommodating sequence changes in beta-hairpins in proteins. *J. Mol. Biol*. **229**, 428–447.
17. Pascarella S., Argos P. 1992. Analysis of insertions/deletions in protein structures. *J. Mol. Biol*. **224**, 461–471.
18. Дерюшева Е.И., Галзитская О.В., Сердюк И.Н. 2008. Предсказание коротких петель в белках с внутренней неупорядоченностью. *Молекуляр. биология*. **42**, 1067–1078.
19. Grantcharova V.P., Riddle D.S., Baker D. 2000. Long-range order in the src SH3 folding transition state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 7084–7089.
20. Batori V., Koide A., Koide S. 2002. Exploring the potential of the monobody scaffold: effects of loop elongation on the stability of a fibronectin type III domain. *Protein Engineering*. **15**, 1015–1020.
21. Baker N.A., Helms V., McCammon J.A. 1999. Dynamical properties of fasciculin-2. *Proteins*. **36**, 447–453.
22. Sgourakis N.G., Yan Y., McCallum S.A., Wang C., Garcia A.E. 2007. The Alzheimer's peptides Aβ40 and Aβ42 adopt distinct conformations in water: a combined MD/NMR study. *J. Mol. Biol*. **368**, 1448–1457.
23. Huynh T., Smith J.C., Sanson A. 2002. Protein unfolding transitions in an intrinsically unstable annexin domain: molecular dynamics simulation and comparison with nuclear magnetic resonance data. *Biophys. J*. **83**, 681–698.